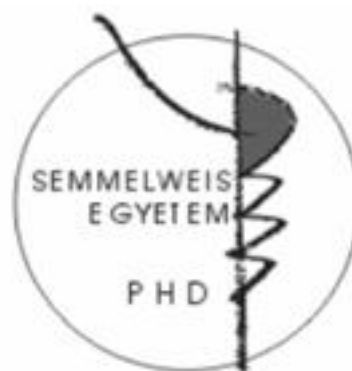


Az ARHGAP25 - egy új GTPáz aktiváló fehérje - sejtélettani szerepének vizsgálata humán fagocitákban

Doktori tézisek

Csépányi-Kömi Roland

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Prechl József tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Söti Csaba egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest
2013

BEVEZETÉS

A neutrofil granulociták, mint a természetes immunrendszer professzionális fagocita sejtjei, elengedhetetlenek a kórokozók elleni védekezésben. A patogéneket mintázatfelismerő, valamint opszonin receptoraik révén ismerik fel, és kötik meg. A receptorok ligandkötése állábképződést indít el, melynek segítségével a részecske a fagoszómába záródva bekebelezésre kerül. A folyamatban kiemelt szerepe van az aktin citoszkeleton gyors átépülésének, mely precíz térbeni és időbeni szabályozást igényel. Az aktin-átrendeződés szabályozásában kulcsszerepet töltenek be a Rho családba tartozó kis G-fehérjék (Rac, Rho, Cdc42).

A kis G-fehérjék GTP-t kötve aktív állapotba kerülnek. Ekkor vesznek fel olyan térszerkezetet, amely lehetővé teszi más effektor fehérjékhez való kötődésüket és a jelátvitel továbbvitelét. A GTP-t elhidrolizálva inaktív, GDP-kötött állapotba jutnak. Ezen molekuláris kapcsolók működését háromféle fehérje szabályozza. A guanin-nukleotid disszociáció inhibitorok (GDI-k) inaktív, GDP-kötött állapotban tartják a kis G-fehérjéket. A guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) elősegítik a GDP disszociációját, ezáltal lehetővé teszik a GTP kötődését. A GTPáz aktiváló fehérjék (GAP-ok) nagymértékben fokozzák a kis G-fehérjék endogén GTP hidrolízisét, ezáltal inaktívják azokat. Így a GAP-ok fontos szerepet töltenek be a jelátviteli útvonalak lezárásában. Ugyanakkor egy-egy GAP gátlása szükséges lehet a szignalizáció elindításához is.

A humán genomban mintegy 70 olyan gént ismerünk, melyek Rac/RhoGAP-okként működhetnek. Közös jellemzőjük, hogy rendelkeznek egy körülbelül 200 aminosav hosszúságú katalitikus doménnel, amely GTPáz aktiváló hatásukért felelős. A GAP doménen belül kiemelt szerepet tölt be egy konzervált arginin aminosav, amely hiányában a GAP aktivitás jelentősen lecsökken, vagy teljesen el is veszhet. A Rac/RhoGAP-okra jellemző változatos doménszerkezet, eddig feltárt működésük, jelátviteli útvonalakban elfoglalt helyük azt valószínűsíti, hogy szabályozó feladataikat specifikus molekuláris környezetben végzik.

Ezidáig öt olyan Rac/RhoGAP-ot azonosítottak (Abr, Bcr, p50RhoGAP, p190RhoGAP, ArhGAP15), amelyek kifejeződnek fagocita sejtekben és részt vesznek a természetes immunválasz szabályozásában. Az Abr-re és Bcr-re nézve kettős

génhiányos egerekben a neutrofil granulociták primer granulumainak fokozott szekrécióját írták le. Emellett megnyúlt morfológiájú makrofágokat figyeltek meg, melyek intenzívebb migrációt és fokozott fagocitózist mutattak. A p50RhoGAP génhiányos egerek neutrofiljei fokozott migrációs készséget mutattak, azonban a sejtek nem voltak képesek irányított (gradiens irányába történő) mozgásra. Úgy találták, hogy a p50 hatását ezen esetekben elsősorban a Cdc42-n keresztül fejtette ki. A p190RhoGAP-ról leírták, hogy humán neutrofilekben részt vesz a RhoA β 2-integrin jelátviteli útvonalon keresztüli szabályozásában. Ugyanakkor újabban beszámoltak arról, hogy egerekben a p190RhoGAP nem elengedhetetlen az integrin-mediált neutrofil funkciók szabályozása során. A p190RhoGAP-nak humán és egér neutrofilekben fellelt eltérő szerepét tekintve felmerül, hogy a Rac/RhoGAP-ok szabályozó szerepe esetleg sejt-, vagy fajspecifikus. Az ArhGAP15 génhiányos egereket vizsgálva azt tapasztalták, hogy a knock-out egerek neutrofiljei fokozott migrációs készséget, fokozott szuperoxid termelést, fokozott fagocitózist és növekedett baktériumölési képességet mutattak. Ezen – döntően genetikailag módosított egereken végzett – kísérletek azonban továbbra sem válaszolják meg azt a kérdést, hogy mely GAP(-ok) szabályozzák a humán neutrofilek funkcióit.

Katoh és munkatársa egy *in silico* munka keretében azonosítottak egy új GAP-ot, az ARHGAP25-öt, amely a GAP doménen kívül tartalmaz még N-terminálisan egy PH domént, valamint C-terminálisan egy szuperhelikális, úgynevezett coiled coil szakaszt. Az Expressed Sequence Tag (EST) adatbázis szerint az ARHGAP25 kiemelkedő expressziót mutat a nyirokszövetekben és a vérben, melyet munkacsoportunk saját Northern blot kísérlete is alátámasztott. Ennek ellenére eddig még soha nem fejezték ki a teljes hosszúságú fehérjét és teljesen ismeretlen volt, hogy van-e fiziológiás funkciója az ARHGAP25-nek fehérvérsejtekben.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő célkitűzéseket tettem:

1. Microarray adatbázisokban vizsgálni az ARHGAP25, illetve más Rac/RhoGAP-ok szöveti expressziós mintázatát.
2. Bakteriális expressziós rendszerben kifejezni a teljes hosszúságú ARHGAP25 fehérjét, valamint különféle fragmenseit.
3. Meghatározni az ARHGAP25 kis G-fehérje specificitását.
4. Megvizsgálni az ARHGAP25 fagocitákban betöltött lehetséges szerepét – esetleges részvételét az aktin citoszkeleton átrendeződés, szuperoxid-termelés, valamint a fagocitózis szabályozásában.

Ez utóbbit tekintve célom volt továbbá egy olyan vizsgálati módszer beállítása, mellyel nagy hatékonysággal, nagy elemszámmal lehet vizsgálni a fagocitózisban bekövetkező változásokat.

MÓDSZEREK

Microarray adatbázisok vizsgálata: Az mRNS microarray adatok kiértékelése során a PubMed GEO DataSets adatbázisból elérhető, Affymetrix Human Genome U133A array-el készült kísérleteket használtuk fel. Az expressziós szinteket a GAPDH értékére normalizáltuk. Az adatok táblázatos ábrázolását Microsoft® Office Excel® 2007 SP2 szoftverrel végeztük.

Sejtek, sejtvonalak: A kísérletek során humán polimorfonukleáris sejteket, a monociták és limfociták kevert populációját (PBMC), humán mandulából nyert T- és B-sejteket, PBMC-ből M-CSF-fel differenciált primer makrofágokat, neutrofil irányba differenciált PLB-985 myelomonoblast sejtvonalat, illetve COS7 és COSphoxFcγR sejtvonalat használtunk. Ez utóbbiak olyan COS7 sejtek, melyeket előzetesen stabilan transzfektáltak a fagocita NADPH oxidáz enzimrendszer komponenseivel és az FcγRIIa receptorról. Az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek transzfektálása során siSTRIKE U6 hairpin cloning system rendszert használtunk. A primer humán makrofágokat Amaxa Human Macrophage Nucleofector Kit segítségével, ARHGAP25-specifikus, illetve kontroll siRNS-sel transzfektáltuk. A COS7 és COSphoxFcγR sejtek tranziens transzfekciójához Eugene HD reagenst használtunk.

Plazmidok, fehérjék: A GST-vel kapcsolt ARHGAP25-öt, valamint különböző darabjait humán fehérvérsejtekből készített cDNS-ből klónoztuk PCR reakció segítségével. A felsokszorozott DNS darabokat pGEX4T-1, illetve pCFP-C1 vektorba illesztettük. Az ARHGAP25 katalitikus doménjében található konzervált arginint QuickChange site-directed mutagenesis kit-tel alaninra cseréltük.

Western blot: A kísérletekhez saját készítésű anti-ARHGAP25 és anti-p50RhoGAP poliklonális antitestet, valamint kereskedelmi forgalmú anti-GST ellenanyagot, illetve anti-β-aktin monoklonális ellenanyagot használtunk.

A GTPáz aktivitás mérése sejtmentes rendszerben: A rekombináns fehérjék GTPáz aktivitását radioaktív GTP segítségével, „nitrocellulose filter-binding assay” módszerrel

mértük. A radioaktivitást Beckman LS 5000TD folyadék-szcintillációs spektrométerben olvastuk le.

A membránfodrozódás vizsgálata: A vizsgálathoz CFP-ARHGAP25-tel, mutáns CFP-ARHGAP25R192A-val, CFP-p50RhoGAP-pal, illetve inzertet nem tartalmazó CFP vektorral transzfektált COS7 sejtet használtunk. A sejteket 20 percig stimuláltuk EGF-fel, a filamentáris aktint Alexa-568-konjugált falloidinnel jelöltük. Az eredményeket konfokális mikroszkóppal értékeltük.

A szuperoxid termelés mérése: Az ARHGAP25-csendesített és kontroll PLB-985 sejtek fagoszómális szuperoxid termelését luminometriás módszerrel, lucigeninnel mértük. A sejteket kevert humán szérummal, vagy hőinaktivált kevert humán szérummal opszonizált zymozannal stimuláltuk. A PMA stimulusra adott extracelluláris szuperoxid termelést citokróim c-vel mértük.

Filamentáris aktin jelölése PLB-985 sejtekben: A filamentáris aktint Alexa488-falloidinnel jelöltük, az eredményeket áramlási citométerrel értékeltük.

Élesztő fagocitózisának vizsgálata áramlási citométerrel: Hövel előlt *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt Cell Tracker Green fluoreszcens festékkel jelöltünk, majd kevert, illetve hőinaktivált kevert humán savóval opszonizáltunk. Az élesztőket 10 percig inkubáltuk együtt a fagocita sejtekkel, az eredményeket áramlási citométerrel értékeltük.

Fagocitózis vizsgálata konfokális mikroszkóppal: A kísérletek során CFP-ARHGAP25-tel, CFP-ARHGAP25R192A-val, CFP-p50RhoGAP-pal, illetve inzertet nem tartalmazó CFP vektorral transzfektált COSphoxFcγR sejteket használtunk. A sejteket 1 órán át inkubáltuk együtt opszonizált, Cell Tracker Red fluoreszcens festékkel jelölt élesztőkkel, majd a fagocitózist konfokális mikroszkóppal értékeltük.

Statisztikai analízis: Az adatok statisztikai elemzéséhez egymintás t-próbát, egyszempontos, illetve kétszempontos ismételt varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk.

A post-hoc összehasonlításhoz a Tukey honest significant difference (Tukey HSD) tesztet használtuk. A szignifikancia határát minden esetben a $p < 0,05$ értéknél húztuk meg. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 7.0 programmal végeztük (Statsoft, Tulsa, Egyesült Államok).

EREDMÉNYEK

Ph.D. munkám egyik részében nyilvános internetes adatbázisokat elemezve vizsgáltam a Rac/RhoGAP-ok szöveti megoszlását. Ehhez 75 humán Rac/RhoGAP-ot azonosítottunk (a GAP-ok nevezéktana rendkívül diverz, ami megnehezíti a publikációkban, vagy adatbázisokban történő azonosításukat). Ezt követően vizsgáltuk a Rac/RhoGAP-ok mRNS microarray expressziós mintázatát, melyet színekódolt táblázatba foglaltunk. A kapott eredmények egybehangzóak voltak az ARHGAP25-ről tett korábbi megfigyeléseinkkel (EST, Northern blot), miszerint a fehérje főleg a lépben és a perifériás vér fehérvérsejtjeiben mutat magas mRNS expressziót. Ugyanakkor a többi GAP-ra vonatkozó expressziós mintázatok kiindulási alapot szolgáltathatnak további kísérletekhez.

Munkám másik részében az ARHGAP25 humán fagocitákban betöltött szerepét vizsgáltam. Elkészítettük a fehérje rekombináns, teljes hosszúságú változatát, valamint különböző fragmenseit. A fehérje coiled coil doménje ellen specifikus ellenanyagot készítettünk, melynek segítségével kimutattuk az ARHGAP25-öt a főbb humán fehérvérsejt típusokban, így neutrofil granulocitákban is.

Sejtmentes kísérleti rendszerben, rekombináns fehérjék és radioaktív GTP felhasználásával vizsgáltuk az ARHGAP25 kis G-fehérje specificitását. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy csak a Rac-ot képes szabályozni, a Rho-t és a Cdc42-t nem. Ezen eredményünket sejtes kísérleti rendszerben is megerősítettük: a túlexpresszált ARHGAP25 gátolta a Rac-függő membránfodrozódást COS7 sejtekben, ugyanakkor nem tapasztaltunk olyan fenotípust, amely a Rho-t szabályozó GAP-okat kifejező sejtekre jellemző. A mutáns ARHGAP25R192A, melyben a GAP domén konzervált argininjét alaninra cseréltük, elvesztette RacGAP aktivitását, így a későbbi kísérletekben, mint funkcióvesztett mutáns volt alkalmazható.

Ezt követően a túlexpresszált ARHGAP25 fagocitózisra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ehhez olyan COSphoxFcγR sejtvonalat használtunk, melyet előzetesen stabilan transzfektáltak a fagocita oxidáz enzimrendszer komponenseivel, illetve az FcγRIIa receptorral. A sejtekhez kevert humán szérummal opsonizált élesztőt adva azt tapasztaltuk, hogy a túlexpresszált ARHGAP25 jelentősen gátolta a fagocitózist. A funkcióvesztett ARHGAP25R192A-nak nem volt ilyen hatása, amely arra utal, hogy az

ARHGAP25 RacGAP-ként vesz részt a fagocitózis szabályozásában. A kontrollként alkalmazott p50RhoGAP, mely ugyancsak képes a Rac-ot szabályozni, nem gátolta a fagocitózist, ami az ARHGAP25 specifikus szerepére utal. A kísérletek során a mutáns ARHGAP25R192A, mely egyébként a vad típusú fehérjéhez hasonló diffúz, citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott, a fagoszóma membrán köré rendeződött. Noha az ARHGAP25 túlexpressziója gátolja a fagocitózist, az esetek mintegy 10%-ában, amikor mégis történt élesztő felvétel, a vad típusú GAP is a fagoszóma membrán közelében dúsult.

További kísérleteinkhez beállítottunk egy áramlási citometrián alapuló módszert, melynek segítségével gyorsan, nagy elemszámmal lehet vizsgálni fluoreszcens részecskék (esetünkben opszonizált élesztő) felvételét. A citometriában a méret jellemzésére az előre irányuló fényszórás (FSC), a granuláltság mérésére pedig az oldalirányú fényszórás (SSC) szolgál. Ezen két paramétert vizsgálva („dot-plot” diagram) jól elkülöníthetők a fagociták és a szabad élesztő részecskék. Annak érdekében, hogy biztosan meg tudjuk különböztetni az élesztőt tartalmazó és a nem fagocitált sejteket, az élesztőket fluoreszcens festékekkel jelöltük. A dot-plot diagramon kikapuztuk a fagocita populációt, majd a kapuzott sejtekre jellemző fluoreszcenciát hisztogramon ábrázoltuk. A hisztogram alapján végül kiszámolható az élesztőt fagocitált sejtek aránya.

Az így beállított módszerrel vizsgáltuk neutrofil irányba differenciáltatott PLB-985 sejtek fagocitózist, melyekben az endogén ARHGAP25-öt specifikus shRNS-sel csendesítettük. Kísérleteink során a csendesített sejtek szignifikánsan hatékonyabban fagocitálták a kevert humán savóval opszonizált élesztőket a kontroll sejtekhez képest. Hasonló eredményt kaptunk ARHGAP25-specifikus, illetve kontroll siRNS-sel kezelt primer humán makrofágokat vizsgálva. Specifikusan az Fc-receptoron (FcR) keresztüli élesztő felvételt úgy vizsgáltuk, hogy hőinaktiváltuk a savót opszonizálás előtt, ezáltal a komplement rendszert és a komplementen keresztüli fagocitózist kikapcsoltuk. Az így opszonizált élesztők PLB-985 sejtek általi felvételének hatékonysága nagymértékben lecsökkent, amely összefüggésben áll a PLB-985 sejtek alacsony FcR expressziójával. A csendesített sejtek ez esetben is több élesztőt fagocitáltak, azonban a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

A fagocitózishoz elengedhetetlen a megfelelő aktin-citoszkeleton átrendeződés, melyben kulcsszerepet játszik a Rac kis G fehérje is, ezért megvizsgáltuk, hogy az ARHGAP25-nek van-e valamilyen hatása a sejtek filamentáris aktin (f-aktin) hálózatára. Azt tapasztaltuk, hogy az ARHGAP25 csendesítése PLB-985 sejtekben tendenciózusan fokozta a filamentáris aktin mennyiségét a kontroll sejtekhez képest.

A PLB-985 sejtek fagoszómális szuperoxid termelésének vizsgálata során opszonizált zymozan stimulust alkalmaztunk. Abban az esetben, ha teljes kevert savóval opszonizált zymozant adtunk a sejtekhez, az ARHGAP25-csendesített sejtek fokozott szuperoxid termeléssel válaszoltak: a szuperoxid termelés sebessége mintegy háromszorosa volt a kontroll sejtekének. Abban az esetben, ha hőinaktivált savóval opszonizáltuk a zymozant, mielőtt a sejtekhez adtuk, a szuperoxid termelés mértéke elmaradt a kevert savóval opszonizált zymozanhoz képest. A sejtek csak mintegy 5 percnyi latencia után kezdtek el szuperoxidot termelni, és a csendesített és kontroll sejtek között nem volt szignifikáns különbség. A PLB-985 sejtek extracelluláris szuperoxid termelését PMA stimulussal váltottuk ki. Ennek során az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek és a kontroll sejtek szuperoxid termelése között nem volt szignifikáns különbség. Ezen megfigyelés arra utal, hogy az ARHGAP25 valószínűleg nem közvetlenül vesz részt a szuperoxid termelés szabályozásában.

KÖVETKEZTETÉSEK

Ph.D. dolgozatomban az ARHGAP25 humán neutrofil granulocitákban betöltött szabályozó szerepével kapcsolatos eredményeimet ismertettem, melyek alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Szöveti expressziós adatbázisok, valamint kollégáim Northern blot kísérlete alapján az ARHGAP25 főként fehérvérsejtekben expresszálódik.
2. Rekombináns módon kifejezhető a teljes hosszúságú fehérje csakúgy, mint különböző fragmentjei.
3. Az ARHGAP25 a Rac kis G-fehérjére specifikus, a Rho-ra és a Cdc42-re nincs szabályozó hatással.
4. A túlexpresszált ARHGAP25 gátolja, a csendesített endogén fehérje fokozza a fagocitózist.
5. A főleg citoszolikus fehérje fagocitózis során a fagoszómamembránhoz helyeződik át.
6. Az ARHGAP25 csendesítése tendenciózus növekedést okoz a filamentáris aktin mennyiségében.
7. Az ARHGAP25 csendesítése fokozza a fagocitózist követő szuperoxid-termelést.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapját képező közlemények

1. **Csépányi-Kömi R**, Sirokmány G, Geiszt M, Ligeti E. (2012) ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 119: 573-582.
IF: 9,898
2. Izsépi E, Balogh A, Farkas A, Molnár A, Solymos E, Tóth EA, **Csépányi-Kömi R**, Matkó J. (2012) The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation. *Immunol Lett*, 143: 106-115.
IF: 2,526
3. **Csépányi-Kömi R**, Sáfár D, Grósz V, Ligeti E. (2013) In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins. *Small GTPases*, közlésre elfogadva, DOI: 10.4161/sgtp.23708
IF: -

Egyéb publikációk

4. **Csépányi-Kömi R**, Lévay M, Ligeti E. (2012) Rho/RacGAPs: embarras de richesse? *Small GTPases*, 3: 178-182.
IF: -
5. **Csépányi-Kömi R**, Lévay M, Ligeti E. (2012) Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 353: 10-20.
IF: 4,192

6. Ligeti E, **Csépányi-Kömi R**, Hunyady L. (2012) Physiological mechanisms of signal termination in biological systems. *Acta Physiol (Oxf)*, 204: 469-478.
IF: 3,09
7. Timár Cs, Lőrincz Á, **Csépányi-Kömi R**, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás E, Iványi Z, Kittel Á, Powell D, McLeish K, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-518.
IF: 9,898